

Modulation der Insulinsynthese

Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere die Verwendung von Substanzen, die die Aktivität der Proteine Caseinkinase II (CK II), 14-3-3 epsilon und/oder des PcG-Proteins EED modulieren oder die Bindung der Proteine Caseinkinase II (CK II), 14-3-3 epsilon, des PcG-Proteins EED und/oder eines Fragments derselben mit dem Protein Pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1), das bei der Glucose-induzierten Insulin-Biosynthese eine entscheidende Rolle spielt, beeinflussen, zur Beeinflussung der Insulin-Synthese bzw. – Bereitstellung.

Im Säugerorganismus wird nach einer Mahlzeit, ausgelöst durch die Glucosebelastung, von den Beta-Zellen der Langerhans'schen Inseln des endokrinen Pancreas in Sekretgranula gespeichertes Insulin sezerniert. Gleichzeitig kommt es zu einer Neusynthese von Insulin (Transcription, Translation). Es wurde festgestellt, daß PDX-1 als Transkriptionsfaktor beteiligt ist (McKinnon and Docherty, Diabetologia (2001), 44: 1203-1214) und die Transkriptions-auslösenden Signalwege durch Wortmannin und SB 203580 hemmbar sind. Derzeit ist aber unbekannt, wie die Vorgänge, die zur Sekretion von Insulin führen, und die Induktion der Neusynthese gekoppelt sind.

Aufgabe ist es daher, Substanzen (Wirkstoffe) zur Verfügung zu stellen, die die Insulin-Bereitstellung wirksam beeinflussen und damit zur Behandlung von Erkrankungen geeignet sind, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert sind oder mit dieser einhergehen, wie z.B. Diabetes.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden überraschend drei Proteine identifiziert, die an den Transkriptionsfaktor PDX-1 binden, der bei der Glucose-induzierten Insulin-Biosynthese eine entscheidende Rolle spielt (vgl. u.a. Lottmann et al., *Journal of Molecular Medicine* (2001) 79:321-328). Direkte, unmittelbare Aktivatoren von PDX-1 sind im Stand der Technik bislang nicht bekannt.

Erfindungsgemäß wurden in einem eigens entwickelten experimentellen Zellsystem nach Induktion mit Glucose Proteine identifiziert, die in dieser Phase i) selbst phosphoryliert werden und ii) mit dem Transkriptionsfaktor PDX-1 physikalisch interagieren. PDX-1 selbst wird ebenfalls Glucose-induziert phosphoryliert, wobei wichtig ist, dass bakteriell exprimiertes PDX-1 erst nach Phosphorylierung an die DNA binden und als Aktivator agieren kann.

In diesem Zusammenhang stellt CK II in der Insulin-produzierenden Zelle eine Glucose-induzierte PDX-1-Kinase dar. Bei der Caseinkinase II handelt es sich um eine weit verbreitete Serin/Threonin-Kinase. Das Holoenzym besteht aus einem Tetramer aus zwei α - oder α' -Untereinheiten (oder jeweils eine dieser Untereinheiten) und zwei β -Untereinheiten (Lotzeman et al., *Biochemistry* 36 (1990) 8436-47). Damit kann erfindungsgemäß über die Veränderung der Aktivität dieses Enzyms die Insulin-Bereitstellung moduliert werden.

Die 14-3-3 Proteine werden als Regulator-Proteine beschrieben, die in der Zelle Schlüsselemente von Signaltransduktionswegen binden (wie z.B. den Transkriptionsfaktor FKHR) und damit inaktivieren können. Erst durch Phosphorylierung der 14-3-3 Proteine wird diese Bindung aufgehoben. Das Protein 14-3-3 epsilon hält im unphosphorylierten Zustand den Transkriptionsfaktor PDX-1 gebunden und inaktiv. Nach Glucose-Induktion wird 14-3-3 epsilon phosphoryliert und kann den gebundenen, inaktiven Transkriptionsfaktor PDX-1 freisetzen, der dann als aktivierender Faktor die Insulinsynthese initiiert.

Das EED-Protein gehört zu den Transkriptions-Repressoren, wobei an dem Vorgang der Repression Histon-Deacetylasen beteiligt zu sein scheinen. Erfindungsgemäß handelt es

sich bei der EED um eine große Isoform des Proteins, auf die in Sewalt et al., Mol. Cell. Biol. 18 (1998) 3586-95 (vgl. Fig. 4) verwiesen wird.

Mit den vorliegenden Arbeiten ist es somit gelungen, die drei genannten Proteine (CK II, 14-3-3 epsilon und EED) als wesentliche regulative Elemente der Glucose-induzierten Insulinbiosynthese zu identifizieren. Der oben dargestellte Zusammenhang mit dem Transkriptionsfaktor PDX-1, mit dem die Proteine physikalisch interagieren, ermöglicht nunmehr die Identifizierung neuer Wirkstoffe, die effizient die Insulin-Bereitstellung beeinflussen können und zur Entwicklung einer neuen, effektiveren Generation von Diabetes-Therapeutika mit weniger Nebenwirkungen führen. Das Screening kann mit geeigneten Assays durchgeführt werden, wie z.B. Bindungsassays, mit deren Hilfe sich die Beeinflussung der Wechselwirkung (Bindung) der genannten Proteine mit PDX-1 direkt untersuchen lässt, oder einem Assay, bei dem man die Funktionalisierung von PDX-1 (Phosphorylierung, DNA-Bindung, Transkriptionsaktivierung) unter Stoffeinfluss analysiert. Die Etablierung solcher Assays ist dem Fachmann wohl bekannt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher die Verwendung eines oder mehrerer Proteine gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon) und 12 (EED) oder Fragmenten derselben zur Durchführung von Bindungsassays unter Verwendung eines Proteins gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1), wobei die Fragmente an PDX-1 binden, zur Identifikation von Substanzen, die die Bindung zwischen dem oder den Proteinen oder Fragment(en) und PDX-1 beeinflussen (fördern, hemmen, modulieren).

Die Erfindung betrifft unter anderem ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die geeignet sind, die Wechselwirkung eines Proteins gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), des Proteins EED oder einem Fragment desselben mit dem Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) zu beeinflussen, bei dem man

- a) das Protein gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), das Protein EED oder ein Fragment derselben markiert,
- b) das Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) markiert,

- c) die markierten Proteine von Stufe a) und Stufe b) miteinander in Kontakt bringt und eine Messung zur Bestimmung des/der Markersignals/Markersignale durchführt,

wobei die Markierungen so gewählt sind, daß eine Wechselwirkung der markierten Proteine von Stufe a) und b) nachweisbar und von den isolierten, markierten Proteinen durch Änderung des/der Detektionssignals/Detektionssignale unterscheidbar ist, man

- d) die Mischung von Stufe c) mit einer zu untersuchenden Substanz in Kontakt bringt und man
- e) eine weitere Messung zur Bestimmung des/der Markersignals/Markersignale durchführt,

wobei die zu untersuchende Substanz eine die Wechselwirkung beeinflussende Substanz ist, wenn sich das(die) in Stufe e) gemessene(n) Markersignal(e) von dem (den) in Stufe c) gemessenen Markersignal(en) unterscheidet.

Ferner eingeschlossen ist ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die geeignet sind, die Wechselwirkung eines Proteins gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), des Proteins EED oder einem Fragment derselben mit dem Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) zu beeinflussen, bei dem man entweder

- a) das Protein gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), das Protein EED, ein Fragment derselben oder
- b) das Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert,
- c) das jeweils andere Protein markiert und es mit dem immobilisierten Protein in Kontakt bringt, wobei man das Vorliegen einer Wechselwirkung zwischen den in a) und b) genannten Proteinen nach Durchführung entsprechender Waschschritte durch Nachweis der Markierung bestätigt, man
- d) die Proteine mit der zu untersuchenden Substanz in Kontakt bringt,

wobei die zu untersuchende Substanz eine die Wechselwirkung beeinflussende Substanz ist, wenn die Markierung nach Zugabe der zu untersuchenden Substanz und Durchführung entsprechender Waschschriffe auf den Mikrotiterplatten nicht mehr nachweisbar ist.

Die mit Hilfe der durchgeföhrten Screening-Verfahren identifizierten Wirkstoffe können zur Behandlung (patho)physiologischer Zustände, bei denen eine gegenüber dem Normalwert verminderte Insulinproduktion beobachtet wird, eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft daher die Verwendung einer Substanz, die die Wechselwirkung eines oder mehrerer Proteine gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon) und EED oder Fragmenten derselben mit dem Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) beeinflusst, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert sind oder mit dieser einhergehen.

Ferner eingeschlossen ist die Verwendung einer Substanz, die

- b) die Aktivität des Proteins gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon) und/oder des Proteins EED moduliert,
- b) an das Protein gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), das Protein EED oder ein Fragment derselben bindet,
- b) das Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1), 4 und/oder 6 und 8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon) oder das Protein EED phosphoryliert, oder
- b) den Anteil des Proteins gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II) erhöht,

zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert sind oder mit dieser einhergehen.

Vorliegend wird unter einer Erkrankung, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert ist oder mit einer verminderten Insulin-Synthese einhergeht, verschiedene Formen von Diabetes, wie z.B. Diabetes mellitus verstanden.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert sind oder mit dieser einhergehen, bei dem man ein vorgenanntes Screening-Verfahren durchführt und man die identifizierte Substanz, die als eine die Wechselwirkung eines Proteins gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), EED oder einem Fragment derselben mit dem Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) beeinflussende Substanz identifiziert ist, mit geeigneten Hilfs- und/oder Trägerstoffen zu einer pharmazeutischen Zusammensetzung formuliert.

Erfindungsgegenstand sind somit auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die eine nach einem vorgenannten Screening-Verfahren erhältliche Substanz und pharmazeutisch verträgliche Hilfs- und/oder Trägerstoffe enthalten.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform können auch eines oder mehrere Proteine gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon) und EED und/oder Fragmente derselben zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur Behandlung einer Erkrankung, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert ist oder mit dieser einhergeht, verwendet werden.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung einer oder mehrerer Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 3 und/oder 5 und 7 oder 9 und/oder einer oder mehrerer für EED kodierender Nukleinsäuren zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur Modulation der Insulin-Synthese in einem Individuum. Diese Präparate können beispielsweise in der Gentherapie, z.B. bei der Generierung artifizieller, insulinproduzierender Zellen für eine Transplantation, Anwendung finden.

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten wurde erstmals das Protein (EED), bei dem es sich um eine EED-Isoform handelt (vgl. Fig. 4 in Sewalt et al. Mol Cell Biol (1998), 18(6): 3586-95), als regulatives Element identifiziert, das ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Insulinbiosynthese spielt. Erfindungsgemäß eingeschlossen sind Fragmente der vorgenannten Proteine, wobei der Begriff EED auch die kürzere Isoformen von EED einschließt (vgl. Fig. 15).

Anhand der gewonnenen Erkenntnisse lassen sich Assays zur Messung der Funktionalisierung von PDX-1 konstruieren, die Aufschluss über die Eigenschaft von Substanzen geben, die Bindung von PDX-1 an den Promotor des Insulin-Gens zu inhibieren bzw. zu fördern. So lassen sich anhand von molekularbiologischen Standardverfahren beispielsweise transgene Zellkulturen etablieren, in die man ein Reportergen einbringt, dessen Genprodukt leicht detektierbar und quantifizierbar ist, und das unter der Kontrolle eines Promotors mit PDX-1-bindenden DNA-Sequenzen stabil exprimiert wird. Unter Induktionsbedingungen, d.h. bei Bindung von PDX-1 an den Promotor, kann dann die Expression des Reportergens unter Einfluss der zu testenden Substanz analysiert werden.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen erläutert.

Beispiele

Material und Methoden

Identifizierung von Glucose-induzierten phosphorylierten Interaktionspartnern von PDX-1:

MIN 6-Zellen wurden bis zur 80%-igen Konfluenz in DMEM kultiviert, das 25 mM Glucose, 10% Pferde-Serum und 2,5% FCS (fötales Kälber-Serum) enthielt. Die Zellen wurden zwei Mal gewaschen, und man ließ die Zellen im Krebs-Ringer-Puffer (118 mM Natriumchlorid, 4,75 mM Kaliumchlorid, 1,25 mM Kalziumchlorid, 1,2 mM Magnesiumchlorid, 0,05% (w/v) BSA, 25 mM Natriumhydrogencarbonat, 10 mM Hepes, pH 7,4) für drei Stunden hungern. Nach der dreistündigen Vorinkubation der Zellen wurden diese mit 500 $\mu\text{Ci/ml}$ (^{32}P)-Phosphorsäure (ICN) für eine Stunde equilibriert und anschließend in Gegenwart oder Abwesenheit von 16 mM Glucose mit und ohne die Kinaseinhibitoren Wortmannin (100 nM, 10 min Vorinkubation) und SB203580 [(4-(4-Fluorphenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)-imidazol] (10 mM, 30 min Vorinkubation) für weitere 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und geerntet. Die Zellen wurden für 30 Sekunden zentrifugiert und in 100 μl 20 mM Hepes 7,8, 50 mM Kaliumchlorid, 1% Triton X-100, 0,1 mM EDTA, 20 mM β -Glycerophosphat, 0,1 mM Na_3PO_4 , vollständiger Miniprotease Inhibitorcocktail (Roche), resuspendiert. Die Zellen



ließ man für 10 Minuten auf Eis anschwellen und zentrifugierte anschließend bei 14.000 U/min. Der Überstand (cytoplasmatischer Extrakt) wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt, und die Proteine wurden unter der Verwendung von Aceton präzipitiert, mehrfach in Aceton gewaschen, getrocknet und in Lysis-Puffer (8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 65 mM Chaps, 120 mM DTT, 80 mM Tris) solubilisiert. Für die präparativen Gele wurden die markierten Extrakte mit 4 mg nicht-radioaktiven cytoplasmatischen Extrakten gemischt, die ähnlich behandelt wurden. Die Proteintrennung erfolgte unter Verwendung eines immobilisierten pH-Gradienten von 3 bis 10 (IPG-Streifen, 18 cm, Amersham Biosciences) in einen IPGphor-isoelektrischem-Focussier-System (Amersham Biosciences). Nach Equilibrieren des Streifens in SDS-Puffer wurde die zweite Dimension der SDS-PAGE über Nacht unter Verwendung eines 12,5%igen Acrylamidgels durchgeführt. Die präparativen Gele wurden mit kolloidalem Coomassi R-250 gefärbt und einer Autoradiographie unter Verwendung eines Phosphor-Imagers (Molecular dynamics) unterworfen. Die analytischen Gele wurden einer Autoradiographie unterworfen. Es wurden sogenannte „Pulldown-Experimente“ unter Verwendung eines bakteriellen exprimierten GST-PDX-1 Proteins als Köder im Cytoplasma von Glucose stimulierten, ^{32}P -markierten MIN6 Zellen durchgeführt. Nach Zugabe von 5 μg GST zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde GST-PDX-1-Fusionsprotein, das an Gluthation-Agarose-Beads gekoppelt war, mit 100 mg cytoplasmatischem Extrakt bei drei Stunden und 4°C und unter durchgehendem Schütteln inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurden die Beads bei 3000 g für 5 Minuten pelletiert, und der Überstand wurde gesammelt und für die zweidimensionale Gelelektrophorese verwendet. Um die Interaktion von Phosphoproteinen mit dem GST-PDX-1 Protein nachzuweisen, wurden die pelletierten Beads 3 Mal gewaschen, in Lysis-Puffer suspendiert und anschließend der zweidimensionalen Gelelektrophorese unterworfen. Die Immunfluoreszenz-Färbung und das Western-Blotting wurden unter Verwendung von Standard-molekularbiologischen Protokollen verwendet.

Ergebnisse:

Im Autoradiogramm des analytischen Gels des "Pulldown" (Fig 5, A) wurden Spots von phosphorylierten, mit PDX-1-interagierenden Proteinen detektiert. Diese Spots konnten in präparativen Gelen Coomassie-gefärbten Spots zugeordnet werden und wurden mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF) identifiziert.

Beschreibung der Figuren

Figur 1:

Schematische Darstellung des Nachweises von Glucose-induzierten Interaktionspartnern von PDX-1

Figur 2:

Auswirkung von Glucose auf die subzelluläre Lokalisation von endogenem PDX-1. A: Die Zellen wurden in Krebs-Ringer-Puffer für vier Stunden mit 0 mM Glucose inkubiert. B: Die Kultur wurde anschließend 30 Minuten bei 16 mM Glucose weiterkultiviert. Endogenes PDX-1 wurde unter Verwendung eines polyclonalen Anti-PDX-1 Antiserums nachgewiesen.

Figur 3:

PDX-1 wird bei hohen Glucosekonzentrationen in MIN6-Zellen modifiziert. Western-Blot-Analyse von nukleären und cytoplasmatischen Extrakten, die aus MIN6-Zellen hergestellt wurden, und in Krebs-Ringer-Puffer bei 0 mM Glucose (Bahn 1) inkubiert und anschließend auf 16 mM Glucose (Bahn 2) transferiert wurden.

Figur 4:

Silberfärbung von bakteriell exprimiertem GST-PDX-1. 5 µg (Bahn 1) und 1 µg (Bahn 2) gereinigtes GST-PDX-1; in *E. coli* exprimiert und mittels Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt.

Figur 5:

Bakteriell exprimiertes GST-PDX-1 präzipitiert Phosphoproteine aus dem Cytoplasma von ³²P-markierten, Glucose-stimulierten MIN6-Zellen.

A: Kartierung von erhaltenen Phosphoproteinen, die durch zweidimensionale Gelelektrophorese nach einem GST-PDX-1-Pulldown-Experiment erhalten wurden.

B: Cytoplasmatische Phosphoproteine, die durch zweidimensionale Gelelektrophorese nach Acetonpräzipitation getrennt wurden.

Figur 6:

Bakteriell exprimiertes GST-PDX-1 verringert die Menge eines Phosphoproteins im Überstand von ^{32}P -markierten, Glucose-stimulierten MIN6-Zellen vor der zweidimensionalen Gelelektrophorese.

A: Die vergrößerte Region des 2D-Gels, das einer Autoradiographie wurde, zeigt die erhaltenen Phosphoproteine.

B: Die vergrößerte Region eines 2D-Gels, das der Autoradiographie unterworfen wurde, zeigt cytoplasmatische Phosphoproteine nach Acetonpräzipitation.

C: Die vergrößerte Region eines 2D-Gels, das der Autoradiographie unterworfen wurde, zeigt cytoplasmatische Phosphoproteine nach Acetonpräzipitation mit nachfolgender Inkubation mit GST-PDX-1 Fusionsproteinen.

Figur 7:

Veränderungen des Phosphorylierungszustands des ausgewählten cytoplasmatischen Proteins als Reaktion auf Glucose und verschiedene Kinaseinhibitoren.

A-D:

Vergrößerte Regionen von 2D-Gelen, die der Autoradiographie nach erfolgter Acetonpräzipitation unterworfen wurden.

A: MIN6-Zellen wurden für 8 Stunden bei 0 mM Glucose in Krebs-Ringer-Puffer inkubiert.

B: Die Kultur wurde auf 16 mM Glucose transferiert.

C: Die Kultur wurde auf 16 mM Glucose in Gegenwart von Wortmannin (100 nM) transferiert.

D: Die Kultur wurde auf 16 mM Glucose in Gegenwart von SB203580 (10 μM) transferiert.

Figur 8:

Identifizierung von 14-3-3-epsilon als Interaktionspartner von GST-PDX-1.

A: Die Ergebnisse der MS-Fit-Suche ergaben Massen eines Phosphoproteins, welches quantitativ aus dem Cytoplasma von Glucose-behandelten MIN6-Zellen unter Verwendung eines bakteriellen exprimierten GST-PDX-1 Proteins präzipitiert werden konnte.

B: Western-Blot unter Verwendung eines Anti-1-4-3-Epsilon-Antiserums (Santa Cruz).
Bahn 1 (Positivkontrolle): 30 µg cytoplasmatischer Extrakt von Glucose-behandelten MIN6-Zellen. Bahn 2 (Negativkontrolle): GST-Pulldown von 400 µg Glucose-behandelten MIN6-Zellen. Bahn 3: GST-PDX-1 Pulldown von 400 µg Glucose-behandelten MIN6-Zellen.

Figur 9:

Aminosäuresequenz von PDX-1 (SEQ ID NO:2).

Figur 10:

Für PDX-1 kodierende Nukleotidsequenz (SEQ ID NO:1).

Figur 11:

Aminosäuresequenz von 14-3-3 epsilon (SEQ ID NO:10).

Figur 12:

Für 14-3-3 epsilon kodierende Nukleotidsequenz (SEQ ID NO:9).

Figur 13:

Aminosäuresequenz der CK II-Untereinheiten

- a) Aminosäuresequenz von CKII-alpha' (SEQ ID NO:4)
- b) Aminosäuresequenz von CKII-alpha (SEQ ID NO:6)
- c) Aminosäuresequenz von CKII-beta (SEQ ID NO:8)

Figur 14:

Für die CK II-Untereinheiten kodierende Nukleotidsequenz

- a) für CKII-alpha' kodierende Nukleotidsequenz (SEQ ID NO:3)
- b) für CKII-alpha kodierende Nukleotidsequenz (SEQ ID NO:5)
- c) für CKII-beta kodierende Nukleotidsequenz (SEQ ID NO:7)

Figur 15:

Nukleotidsequenzen der kurzen EED-Isoform (SEQ ID NO:11)

Figur 16:

Aminosäuresequenzen der kurzen EED-Isoform (SEQ ID NO:12)

Patentansprüche

1. Verwendung eines oder mehrerer Proteine gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), EED oder Fragmenten derselben zur Durchführung von Bindungsassays unter Verwendung eines Proteins gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1), wobei die Fragmente an PDX-1 binden, zur Identifikation von Substanzen, die die Bindung zwischen dem oder den Proteinen oder Fragment(en) und PDX-1 beeinflussen (fördern, hemmen, modulieren).
2. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die geeignet sind, die Wechselwirkung eines Proteins gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), des Proteins EED oder einem Fragment derselben mit dem Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) zu beeinflussen, bei dem man
 - a) das Protein gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), das Protein EED oder ein Fragment derselben markiert,
 - b) das Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) markiert,
 - c) die markierten Proteine von Stufe a) und Stufe b) miteinander in Kontakt bringt und eine Messung zur Bestimmung des/der Markersignals/Markersignale durchführt,wobei die Markierungen so gewählt sind, daß eine Wechselwirkung der markierten Proteine von Stufe a) und b) nachweisbar und von den isolierten, markierten Proteinen durch Änderung des/der Detektionssignals/Detektionssignale unterscheidbar ist, man
 - d) die Mischung von Stufe c) mit einer zu untersuchenden Substanz in Kontakt bringt und man
 - e) eine weitere Messung zur Bestimmung des/der Markersignals/Markersignale durchführt,

wobei die zu untersuchende Substanz eine die Wechselwirkung beeinflussende Substanz ist, wenn sich das(die) in Stufe e) gemessene(n) Markersignal(e) von dem(den)

in Stufe c) gemessenen Markersignal(en) unterscheidet.

3. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die geeignet sind, die Wechselwirkung eines Proteins gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), EED oder einem Fragment derselben mit dem Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) zu beeinflussen, bei dem man entweder
 - a) das Protein gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), das Protein EED, ein Fragment derselben oder
 - b) das Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert,
 - c) das jeweils andere Protein markiert und es mit dem immobilisierten Protein in Kontakt bringt, wobei man das Vorliegen einer Wechselwirkung zwischen den in a) und b) genannten Proteinen nach Durchführung entsprechender Waschschritte durch Nachweis der Markierung bestätigt, man
 - d) die Proteine mit der zu untersuchenden Substanz in Kontakt bringt,

wobei die zu untersuchende Substanz eine die Wechselwirkung beeinflussende Substanz ist, wenn die Markierung nach Zugabe der zu untersuchenden Substanz und Durchführung entsprechender Waschschritte auf den Mikrotiterplatten nicht mehr nachweisbar ist.

4. Verwendung einer Substanz, die die Wechselwirkung eines oder mehrerer Proteine gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), EED oder Fragmenten derselben mit dem Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) beeinflusst, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert sind oder mit dieser einhergehen.
5. Verwendung einer Substanz, die
 - a) die Aktivität des Protein gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon) und/oder des Proteins EED moduliert,

- b) an das Protein gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), das Protein EED oder ein Fragment derselben bindet,
- c) das Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1), SEQ ID:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon) oder das Protein EED phosphoryliert, oder
- d) den Anteil des Proteins gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II) erhöht,

zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert sind oder mit dieser einhergehen.

- 6. Verwendung nach den Ansprüchen 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert ist oder mit dieser einhergeht, Diabetes ist.
- 7. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert sind oder mit dieser einhergehen, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Verfahren nach den Ansprüchen 2 oder 3 durchführt und man die Substanz, die als eine die Wechselwirkung eines Proteins gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), EED oder einem Fragment derselben mit dem Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) beeinflussende Substanz identifiziert ist, mit geeigneten Hilfs- und/oder Trägerstoffen zu einer pharmazeutischen Zusammensetzung formuliert.
- 8. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine nach einem Verfahren gemäß den Ansprüchen 2 oder 3 erhältliche Substanz und pharmazeutisch verträgliche Hilfs- und/oder Trägerstoffe enthält.
- 9. Verwendung eines oder mehrerer Proteine gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), EED und/oder Fragmenten der-

selben zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur Behandlung einer Erkrankung, die durch eine erhöhte Insulin-Synthese charakterisiert ist oder dieser einhergeht.

10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung Diabetes ist.
11. Verwendung einer oder mehrerer Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 3 und/oder 5 und 7 oder 9 und/oder einer oder mehrerer für EED kodierender Nukleinsäuren zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur Modulation der Insulin-Synthese in einem Individuum.

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. März 2004 (18.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/022772 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP2003/009757**

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. September 2003 (02.09.2003)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
102 41 111.5 3. September 2002 (03.09.2002) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **ERNST-MORITZ-ARNDT-UNI VERSITÄT GREIFSWALD [DE/DE]**; Domstr. 14, 17487 Greifswald (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WALTHER, Reinhard** [DE/DE]; Grüner Weg 9A, 17498 Neuenkirchen (DE).

(74) Anwälte: **WEBER-QUITZAU, Martin** usw.; Uexküll & Stolberg, Beselerstr. 4, 22607 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **MODULATION OF THE SYNTHESIS OF INSULIN**

(54) Bezeichnung: **MODULATION DER INSULINSYNTHESE**

(57) **Abstract:** The invention particularly relates to the use of substances, which modulate the activity of the proteins casein kinase II (CK II) and 14-3-3 epsilon and/or of the PcG protein EED or which influence the binding of the proteins casein kinase II (CK II) and 14-3-3 epsilon, of the PcG protein EED and/or of a fragment thereof with the protein pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1) that plays a decisive roll in the glucose-induced biosynthesis of insulin, for influencing the synthesis of insulin or the provision of insulin.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere die Verwendung von Substanzen, die die Aktivität der Proteine Caseinkinase II (CK II), 14-3-3 epsilon und/oder des PcG-Proteins EED modulieren oder die Bindung der Proteine Caseinkinase II (CK II), 14-3-3 epsilon, des PcG-Proteins EED und/oder eines Fragments desselben mit dem Protein Pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1), das bei der Glucose-induzierten Insulin-Biosynthese eine entscheidende Rolle spielt, beeinflussen, zur Beeinflussung der Insulin-Synthese bzw. Bereitstellung.



WO 2004/022772 A2